

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number : 07-242680
 (43) Date of publication of application : 19.09.1995

(51) Int.CI.

C07F 9/10
A61K 9/127

(21) Application number : 06-035092

(71) Applicant : NIPPON OIL & FATS CO LTD

(22) Date of filing : 04.03.1994

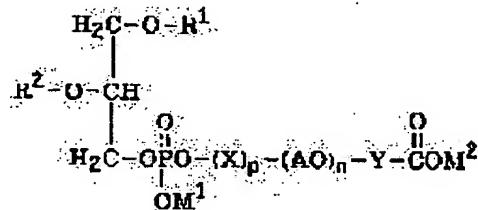
(72) Inventor : MIYAZAKI TAKESHI
NISHIDA MITSUHIRO
SUGINAKA AKINORI

(54) REACTIVE SMALL CAPSULATED MATERIAL, FORMING AGENT AND SMALL CAPSULATED MATERIAL HAVING IMMOBILIZED-FUNCTIONAL MATERIAL

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain the subject forming agent composed of a specific polyalkylene oxide derivative and capable of introducing a (poly)oxyalkylene chain into a small capsulated material, e.g. liposome and easily and efficiently immobilizing various kinds of functional materials at the tip of the chain.

CONSTITUTION: This forming agent is composed of a reactive polyalkyleneoxide derivative of the formula [R1 and R2 are each a 3-30C aliphatic acid acyl residue; AO is a 2-4C oxyalkylene; (n) is an average addition molar number of the AO of 1-1000; X and Y are each a divalent organic group; (p) is 0 or 1; M1 and M2 are each H or an alkali metal atom]. Further, the compound of the formula is obtained e.g. by reacting phosphatidylethanolamine and a (poly) alkylene oxide derivative having carboxylic acid halides at both ends at the charging molar ratio of 1:1 to 1:1000 with each other in the presence of a tertiary amine, e.g. triethylamine and subsequently hydrolyzing an active ester group remaining in the reaction mixture.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 27.02.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3620059

[Date of registration] 26.11.2004

[Number of appeal against examiner's decision]

Best Available Copy

[Date of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-242680

(43)公開日 平成7年(1995)9月19日

(51)Int.Cl.⁶
C 0 7 F 9/10
A 6 1 K 9/127

識別記号 B 9155-4H
F

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数4 OL (全10頁)

(21)出願番号 特願平6-35092
(22)出願日 平成6年(1994)3月4日

(71)出願人 000004341
日本油脂株式会社
東京都渋谷区恵比寿四丁目20番3号
(72)発明者 宮崎 剛
茨城県つくば市梅園2-15-5
(72)発明者 西田 光広
兵庫県尼崎市武庫之荘西2-53
(72)発明者 杉中 昭典
神奈川県茅ヶ崎市室田2-4-10
(74)代理人 弁理士 柳原 成

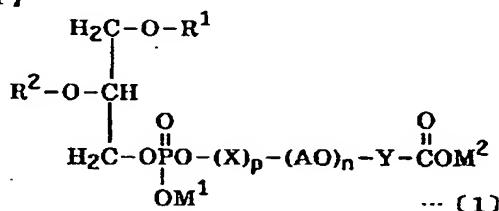
(54)【発明の名称】 反応性小胞体、形成剤および機能性物質固定化小胞体

(57)【要約】

【目的】 リポソーム表面に存在するポリオキシアルキレン鎖の先端に機能性物質を固定した機能性物質固定化リポソームを得る。

【構成】 ポリオキシアルキレン鎖が結合した下式のポリアルキレンオキシド誘導体を膜形成成分として含む反応性リポソームに、脱水縮合剤の存在下に、機能性物質を反応させ、アミド結合により機能性物質を固定化する。

【化1】

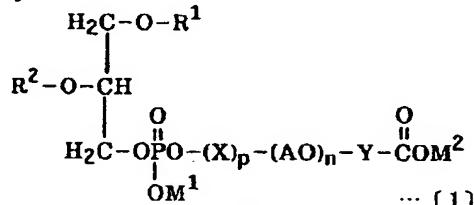


(R¹、R²はアシル基、AOはオキシアルキレン基、X、Yは2価の有機基、nは1~1000、pは0または1、M¹、M²はHまたはアルカリ金属)

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記一般式〔1〕で表わされる反応性ポリアルキレンオキシド誘導体からなることを特徴とする反応性小胞体形成剤。

【化1】



〔式中、 R^1 および R^2 は炭素数3～30の脂肪酸のアシル残基を表わし、同一でも異なっていてもよい。 AO は炭素数2～4のオキシアルキレン基、 n はオキシアルキレン基の平均付加モル数で、1～1000の正数を表わす。 n が2以上の場合、オキシアルキレン基は同一でも異なっていてもよく、またランダム状に付加していても、ブロック状に付加していてもよい。 X および Y は2価の有機残基、 p は0または1、 M^1 および M^2 は水素原子またはアルカリ金属原子を表わす。〕

【請求項2】 請求項1記載の反応性小胞体形成剤の一種以上を小胞体形成成分として含むことを特徴とする反応性小胞体。

【請求項3】 請求項2記載の反応性小胞体に機能性物質を固定してなることを特徴とする機能性物質固定化小胞体。

【請求項4】 水溶性の脱水縮合剤の存在下に、請求項2記載の反応性小胞体に機能性物質を反応させることを特徴とする機能性物質固定化小胞体の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、反応性小胞体形成剤、これを小胞体形成成分として含む反応性小胞体、この小胞体に機能性物質を固定化した機能性物質固定化小胞体、およびその製造方法に関する。さらに詳しくは医薬の運搬体、検査薬、診断薬、センサー、固定化触媒、バイオリアクター、バイオエレクトロニクス素子、マイクロカプセル代替品など、種々の機能性リポソームまたは脂肪乳剤等の小胞体の製造などに用いられる反応性小胞体形成剤、これを小胞体形成成分として含む反応性小胞体、この小胞体に機能性物質を固定化した機能性物質固定化小胞体、およびその製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 リポソームはリン脂質の二分子膜からなる小胞体であり、多分野での応用が試みられている。特に、医薬運搬体、診断・検出用のセンサーなどへの応用が注目されているが、リポソーム表面上または膜中に機能性物質を固定して各種機能をもたせること、およびリポソームの血中濃度を維持することなどが大きな課題となっている。

【0003】 従来、リポソーム表面上または膜中への機能性物質の固定化に関しては、ブルラン誘導体で被覆したリポソームの表面上の多糖上に置換したアミノエチルカルバミルメチル基にγ-マレイミドプロピルオキシサクシニミジルを介して抗体フラグメントを結合させる方法 (Biochem. Biophys. Acta., 898, 323(1987))、あるいはあらかじめリポソーム膜形成成分中に糖脂質を加えておき、リポソーム形成後過疎酸化を行い、生じたアルデヒド基と抗体とを反応させて固定化する方法 (J. Biol. Chem., 255, 10509(1980))、などがある。

【0004】 しかし、これらの従来法では、リポソーム調製後にリポソーム膜表面上での多段階の化学反応を行う必要があり、このため目的とする機能性物質の導入量が低く制限され、また反応による副生成物や不純物が混入し、リポソーム膜へのダメージが大きいなどの問題点がある。

【0005】 一方、リポソームを生体内へ投与したとき、その多くは肝臓、脾臓などの網内系器官で捕捉されるため、十分な効果が得られないことが指摘されている

(Cancer Res., 43, 5328(1983))。そこで、この網内系器官で捕捉されてしまう問題点や、あるいはリポソーム自身の崩壊性・凝集性など安定性の低さに関する問題点を改善する方法として、リポソームの表面にポリエチレングリコール鎖を導入することが試みられている（例えば、特開平1-249717号公報、FEBS letters, 268, 235(1990)）。また、ポリエチレングリコールで修飾されたリポソームは、長期間にわたり血液中濃度を維持できることが明らかになっている (Biochem. Biophys. Acta., 1066, 29-36(1991))。しかし、このような方法により得られるポリエチレングリコール鎖の導入されたリポソームは機能性物質と反応しないので、リポソーム表面上に機能性物質を固定化することはできない。

【0006】 さらに、特表平4-346918号公報には、マレイミド基を有するリポソームにまずチオール基を付与したタンパク質（チオール化タンパク質）を反応させ、次いで残存マレイミド基にチオール基を付与したポリアルキレングリコール（チオール化ポリアルキレングリコール）部分を含む化合物を反応させることにより、網内系器官での取込の改善された薬剤含有抗体結合リポソームが得られることが記載されている。しかし、このリポソームでは、抗体がポリアルキレングリコール層の下部に隠蔽され、標的部位の抗原との反応が妨げられるため、期待される効果が十分には得られないという問題点がある。

【0007】 また特表平5-508388号公報には、α-ステアリル-ω-プロピオン酸-ポリオキシエチレンに代表されるようなアニオン基を有するポリエチレングリコール誘導体からなるリポソーム製剤が開示されている。しかし、このポリエチレングリコール誘導体は、疎水部がモノアルキル基であるためリポソーム膜から脱

離しやすく、このためこのようなポリエチレングリコール誘導体を膜形成成分として含むリポソームは長期間の安定性に劣るという問題点がある。

【0008】

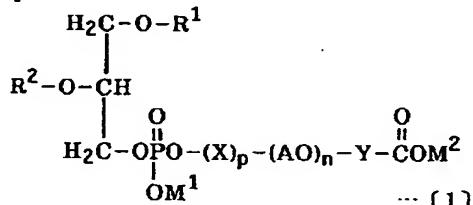
【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、上記問題点を解決するため、リポソームその他の小胞体に（ポリ）オキシアルキレン鎖を導入できるとともに、脱離することなく長期にわたり安定して保持され、しかも（ポリ）オキシアルキレン鎖の先端に、簡単にかつ効率よく種々の機能性物質を共有結合によりまたは電気的に固定化することが可能な反応性小胞体形成剤、この形成剤を小胞体形成成分として含む反応性小胞体、この反応性小胞体に機能性物質を固定した機能性物質固定化小胞体、および固定化小胞体の製造方法を提供することである。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明は、次の反応性小胞体形成剤、反応性小胞体、機能性物質固定化小胞体、およびその製造方法である。

(1) 下記一般式〔1〕で表わされる反応性ポリアルキレンオキシド誘導体からなることを特徴とする反応性小胞体形成剤。

【化2】



〔式中、R¹およびR²は炭素数3～30の脂肪酸のアシル残基を表わし、同一でも異なっていてもよい。AOは炭素数2～4のオキシアルキレン基、nはオキシアルキレン基の平均付加モル数で、1～1000の正数を表わす。nが2以上の場合、オキシアルキレン基は同一でも異なっていてもよく、またランダム状に付加していくも、ブロック状に付加していくてもよい。XおよびYは2価の有機残基、pは0または1、M¹およびM²は水素原子またはアルカリ金属原子を表わす。〕

(2) 上記(1)記載の反応性小胞体形成剤の一種以上を小胞体形成成分として含むことを特徴とする反応性小胞体。

(3) 上記(2)記載の反応性小胞体に機能性物質を固定してなることを特徴とする機能性物質固定化小胞体。

(4) 水溶性の脱水縮合剤の存在下に、上記(2)記載の反応性小胞体に機能性物質を反応させることを特徴とする機能性物質固定化小胞体の製造方法。

【0010】本発明において、「(ポリ)オキシアルキレン」はnが1のオキシアルキレンまたはnが2以上のポリオキシアルキレンを意味する。また「(ポリ)アルキレン」も上記と同様にアルキレンまたはポリアルキ

ンを意味する。

【0011】一般式〔1〕においてR¹またはR²で表わされる脂肪酸のアシル残基は、炭素数3～30、好ましくは8～20のアシル残基である。このようなアシル残基の具体的なものとしては、プロピオン酸、酪酸、カプロン酸、カブリル酸、ペラルゴン酸、カプリン酸、ウンデカン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキン酸、ベヘン酸、リグノセリン酸、ソロチニン酸、モンタン酸、メリシン酸、2-エチルヘキサン酸等の飽和脂肪酸のアシル残基；オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、エルカ酸、2, 4-オクタデカジエン酸等の不飽和脂肪酸のアシル残基；イソステアリン酸等の分岐脂肪酸のアシル残基；リシノール酸、1-2-ヒドロキシステアリン酸等のアルキル基中に水酸基を有する脂肪酸のアシル残基などがあげられる。

【0012】本発明の反応性小胞体形成剤をリポソームまたは脂肪乳剤などの製造に用いる場合は、R¹またはR²で表わされる脂肪酸のアシル残基は、安定なリポソームまたは脂肪乳剤が形成できるという理由から、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、2, 4-オクタデカジエン酸のアシル残基が好ましく、特にパルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸のアシル残基が好ましい。R¹とR²とは同一であってもよいし、異なっていてもよい。

【0013】一般式〔1〕のAOで表わされるオキシアルキレン基は、炭素数2～4のオキシアルキレン基であり、オキシエチレン基、オキシプロピレン基、オキシトリメチレン基、オキシー1-エチルエチレン基、オキシ-1, 2-ジメチルエチレン基、オキシテトラメチレン基などがあげられる。これらのオキシアルキレン基は、エチレンオキシド、プロピレンオキシド、オキセタン、1-ブテンオキシド、2-ブテンオキシド、テトラヒドロフランなどのアルキレンオキシドを付加重合させた基である。一般式〔1〕のnはオキシアルキレン基の平均付加モル数であり、1～1000、好ましくは10～500、さらに好ましくは20～300の正数である。

【0014】nが2以上の場合、オキシアルキレン基の種類は同一のものでも、異なるものでもよい。後者の場合、ランダム状に付加していくも、ブロック状に付加していくてもよい。親水性を付与する場合、AOとしてはエチレンオキシドが単独で付加したものが好ましく、この場合、nが10以上のものが好ましい。また種類の異なるアルキレンオキシドが付加している場合、エチレンオキシドが20モル%以上、好ましくは50モル%以上付加しているのが望ましい。(ポリ)オキシアルキレン鎖に親油性を付与する場合はエチレンオキシド以外の付加モル数を多くする。

【0015】一般式〔1〕のM¹およびM²は水素原子またはナトリウムもしくはカリウム等のアルカリ金属原子であり、同一でも異なっていてもよい。一般式〔1〕の

XおよびYは2価の有機残基を表わす。Xの具体的なものとしては、次のような基などがあげられる。式中、qは1~4の整数を表わす。

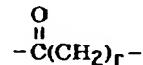
【化3】



またYの具体的なものとしては、次のような基などがあげられる。式中、rは1~4の整数を表わす。

【0016】

【化4】



【0017】一般式〔1〕で表わされる反応性(ポリ)アルキレンオキシド誘導体は、例えば次のような種々の方法により、容易に製造することができる。

1) ホスファチジルエタノールアミンと、両末端にカルボン酸ハライド基を有する(ポリ)アルキレンオキシド誘導体とをトリエチルアミン、ピリジンなどの第3級アミンの存在下で、1:1~1:1000モルの仕込み比で反応させ、次に得られた化合物中に残存する活性エステル基を加水分解して得る方法。

2) ホスファチジルエタノールアミンと、両末端にカルボニル-N-オキシシコハク酸イミド基、あるいはカルボニル-1-オキシベンゾトリアゾール基、カルボニル-N-オキシー-5-ノルボルネー-2,3-ジカルボキシイミド、カルボニル-N-オキシフタルイミド、カルボニル-4-オキシフェニルジメチルスルホニウム=メチルサルフェートなどの活性化エステル基を有する(ポリ)アルキレンオキシド誘導体とを、1:1~1:100モルの仕込み比で反応させ、次に得られた化合物中に残存する活性エステル基を加水分解して得る方法。

3) ホスファチジルエタノールアミンと、両末端にオキシカルボニルイミダゾール基を有する(ポリ)アルキレンオキシド誘導体とを、1:1~1:100モルの仕込み比で反応させ、次に得られた化合物中に残存するオキシカルボニルイミダゾール基を加水分解し、次に得られた化合物にさらに無水コハク酸、またはモノクロロ酢酸などを作用させて得る方法。

4) ホスファチジルコリンと両末端に水酸基を有する(ポリ)アルキレンオキシドとを、1:1~1:100モルの仕込み比で、ホスホリバーゼDの存在下でエ斯特ル交換反応を行い、得られた化合物にさらに無水コハ

ク酸、またはモノクロロ酢酸などを作用させて得る方法。

【0018】これらの反応は無溶媒で、または水、生理的食塩水、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、炭酸緩衝液などの水系溶媒中で、またはクロロホルム、塩化メチレン、ベンゼン、ジエチルエーテル、メタノール、エタノール、テトラヒドロフラン、1,4-ジオキサン、アセトニトリル等の有機溶媒中で、反応温度-100~-+100℃、好ましくは0~40℃、反応時間10分間~500時間、好ましくは30分間~12時間で行うのが望ましい。反応終了後は、蒸留、再結晶、再沈殿、吸着剤処理、カラム処理、イオン交換、ゲル濾過、限外濾過、透析、薄層クロマトグラフィーなどの方法により単離・精製することができる。

【0019】本発明の反応性小胞体形成剤は、疎水性に富む2本の脂肪酸残基と、親水性に富む(ポリ)オキシアルキレン基とを有しているので、優れた界面活性能を有している。このため、本発明の反応性小胞体形成剤は、小胞体形成成分などとして使用することができる。

20 ここで小胞体とは、小胞体形成成分の親水基が界面の水相に向って配向した構造を有する粒子を意味する。具体的なものとしては、二分子膜からなる閉鎖小胞であるリポソーム、植物油およびリン脂質などの混合物が乳化された脂肪乳剤、またはミセルなどがあげられる。

【0020】本発明の反応性小胞体形成剤は、末端に官能性としてカルボキシル基を有しているので、アミノ基、水酸基またはチオール基などの官能基、特に第1級アミノ基に対して高い反応性を有している。このため、このような官能基を有する機能性物質と容易に反応し、共有結合が形成される。またカルボキシル基がプラスの電荷を有する機能性物質と容易に電気的に結合する。従って、本発明の反応性小胞体形成剤を小胞体形成成分として用いることにより、小胞体に(ポリ)オキシアルキレン鎖を導入できるとともに、前記官能基を有する機能性物質またはプラスの電荷を有する機能性物質に対する反応性を付与することができ、反応性小胞体を製造することができる。

【0021】また本発明の反応性小胞体形成剤はR¹およびR²の2本の脂肪酸アシル残基を有しているため、

40 小胞体中、特にリポソーム膜中から脱離しにくい。このため本発明の反応性小胞体形成剤を小胞体形成成分として含む小胞体、特にリポソームは、1本の脂肪酸残基からなるノニオン系界面活性剤を膜形成成分として含むリポソームに比べて、優れた安定性を有するものとなる。

【0022】本発明の反応性小胞体形成剤を用いて小胞体を製造する場合、反応性小胞体形成剤は一種単独で、または二種以上組合せて、あるいは小胞体を形成しうる他の小胞体形成成分、例えば大豆レシチン、卵黄レシチン、その他のリン脂質類、コレステロール、イントラリビッド(大塚製薬(株)、商標)、大豆油、サフラワー

油などと混合して使用することができ、反応性リポソームをはじめ反応性脂肪乳剤、反応性ミセルなどの反応性小胞体を形成することができる。この場合、小胞体は公知の方法により製造することができる。

【0023】本発明の反応性小胞体形成剤を用いて得られた反応性小胞体は、一般式〔1〕で表わされる化合物中のカルボキシル基が小胞体の表面に存在するので、この基を官能基として利用して、水溶性の脱水縮合剤などを用いることにより種々の機能性物質を共有結合により導入することができる。また種々の機能性物質を電気的に固定化することもできる。これにより機能性物質固定化小胞体が得られる。

【0024】次に本発明の反応性小胞体形成剤を用いて製造したそれぞれの反応性小胞体、および機能性物質固定化小胞体について詳しく説明する。代表的な反応性小胞体である反応性リポソームは、本発明の反応性小胞体形成剤を膜形成成分（小胞体形成成分）として含有するものである。反応性小胞体形成剤の含有量は、反応性小胞体形成剤および他の膜形成成分の合計量に対して0.1～50モル%、好ましくは0.5～30モル%であるのが望ましい。0.1モル%未満では期待される効果が小さくなるため、一般的には使用されない。また50モル%を超えるとリポソームの安定性が低下するため一般的には使用されない。全膜形成成分中に占める本発明の反応性小胞体形成剤の割合を多くするほど、固定化する機能性物質の量をより多くすることができる。反応性小胞体形成剤は、一種単独で使用することもできるし、二種以上のものを組合せて使用することもできる。

【0025】反応性小胞体形成剤と混合して用いられる他の膜形成成分としては、従来からリポソームの膜形成成分として用いられているものが制限なく使用できる。具体的には、ジホスファチジルグリセロール、カルジオリビン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、大豆レシチン、卵黄レシチン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール等のリン脂質および脂肪酸部に不飽和基を有する重合性リン脂質；スルホキシリボシルジグリセリド、ジガラクトシルジグリセリド、ラクトシルジグリセリド等の糖脂質類；コレステロール等の非極性脂質；その他には、非イオン性界面活性剤、ホスファチジルポリエチレングリコール、「Biochem. Biophys. Acta., 1066, 29-36(1991)」に記載されているホスファチジルエタノールアミンとポリエチレングリコールとの反応物、およびこれらの混合物などがあげられる。

【0026】反応性リポソームは、反応性小胞体形成剤およびレシチン、コレステロール、リン脂質等の他の膜形成成分を、有機溶媒等の適当な溶媒に溶解し、エクスツルージョン法、ボルテックスミキサー法、超音波法、界面活性剤除去法、逆層蒸発法、エタノール注入法、ブレベシクル法、フレンチプレス法、W/O/Wエマルジ

ョン法、アニーリング法、凍結融解法など、種々の公知の方法によりリポソーム化することにより製造することができる。また、これらの製造法を選択することにより、多重層リポソーム、小さな一枚膜リポソーム、大きな一枚膜リポソームなど、種々の大きさや形態を有する反応性リポソームを製造することができる。

【0027】このようにして得られた反応性リポソームは、リポソーム膜の内外表面に（ポリ）オキシアルキレンからなるスペーサーを介してカルボキシル基が結合しているので、アミノ基、水酸基、チオール基などの官能基、特に第1級アミノ基を有する機能性物質を効率よくかつ簡単に、リポソームの二分子膜上に（ポリ）オキシアルキレンからなるスペーサーを介して、アミド結合、エステル結合またはチオールエステル結合により化学的に固定化することができ、機能性物質固定化リポソームが得られる。またカルボキシル基に、プラスの電荷を有する機能性物質を電気的に固定化することができ、機能性物質固定化リポソームが得られる。

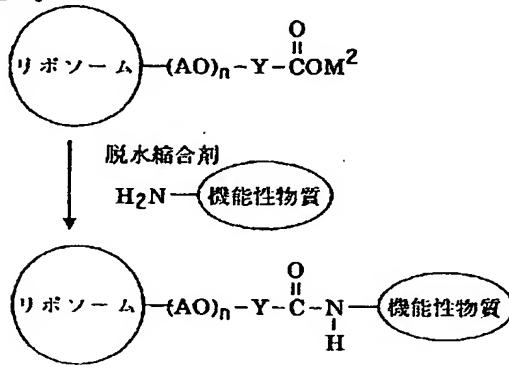
【0028】反応性リポソームに固定化できる機能性物質としては、例えは色素、染料、放射線ラベル化合物、蛍光化合物、化学発光化合物、電極感応性化合物等の標識物質；光応答性化合物、pH応答性化合物、熱応答性化合物等の外部刺激応答性化合物；酵素、抗体、その他のタンパク質、糖、脂質、糖タンパク質、糖脂質、ホルモン等の生理活性物質；医薬などであって、分子中にアミノ基、水酸基またはチオール基を有するもの、またはプラスの電荷を有するものなどがあげられる。これらの中では、アミノ基、特に第1級アミノ基を有する機能性物質が好ましい。

【0029】反応性リポソーム上への機能性物質の共有結合による固定化反応は、N-シクロヘキシル-N'-(2-モルホリノエチル)カルボジイミド=メソ-p-トルエンスルホネート、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩など、カルボキシル基と前記官能基とを脱水縮合させることができ可能な水溶性の脱水縮合剤の存在下、生理的食塩水、またはpH=3～10、好ましくは4～8のリン酸緩衝液、炭酸緩衝液、トリス緩衝液、酢酸緩衝液等の種々の緩衝液などの水系溶媒、またはこれらの水系溶媒とメタノール、エタノール、アセトン、アセトニトリル、テトラヒドロフラン、1,4-ジオキサン、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセタミド、ジメチルスルホキシド、ピロリドン等の有機溶媒との混合溶媒中で、反応性リポソームと前記官能基を有する機能性物質とを-10～+100℃、アミノ基との反応の場合は好ましくは0～60℃、さらに好ましくは0～40℃、水酸基またはチオール基との反応の場合は好ましくは30～80℃で、10分間～300時間、好ましくは30分間～24時間攪拌下に反応させる方法などにより、一段階で容易に行うことができる。これらの条件外では、リポソームの安定性が悪

くなるため好ましくない。このようにして反応させることにより、リポソーム外表面に伸びる(ポリ)オキシアルキレンの先端に機能性物質が共有結合により固定化された機能性物質固定化リポソームが得られる。

【0030】リポソーム表面上でのアミノ基を有する機能性物質の固定化反応を模式的に示すと次のようになる。式中、AO、n、Y、M²は前記と同じものを示す。

【化5】



【0031】機能性物質を電気的に固定化する場合は、種々の緩衝液等の水系溶媒中で、反応性リポソームにプラスの電荷を有する機能性物質を接触させることにより、一段階で容易に行うことができる。

【0032】反応性リポソームの内部には、一般的のリポソームと同様に種々の物質を公知の方法により封入することが可能である。被封入物質としては、例えば色素、染料、放射線ラベル化合物、蛍光化合物、化学発光化合物等の標識物質；光応答性化合物、pH応答性化合物、熱応答性化合物、電極感応性化合物等の外部刺激応答性化合物；酵素、抗体、その他のタンパク質、糖、脂質、糖タンパク質、糖脂質、ホルモン等の生理活性物質；医薬；ポリアクリルアミド、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、ヒアルロン酸等の水溶性高分子類などがあげられる。固定化反応または封入操作の終了後は、必要によりゲル濾過、限外濾過、透析、遠心分離、静置沈降分離等の方法により精製を行うことができる。

【0033】機能性物質固定化リポソームは、(ポリ)オキシアルキレン鎖の先端に機能性物質が固定化されているので、(ポリ)オキシアルキレン鎖に邪魔されるとなく機能性物質の作用が十分に発揮される。また、

(ポリ)オキシアルキレン鎖が導入されているので、従来からの(ポリ)オキシアルキレン鎖導入の効果、例えば長期間にわたる血液中濃度の維持、非免疫原性、リポソーム内部に封入した物質の漏れ防止などの効果も期待できる。このため反応性リポソームは、機能性物質を固定化して機能性物質固定化リポソームの形態で、医薬の運搬体、検査薬、診断薬、センサー、固定化触媒、バイオリアクター、バイオエレクトロニクス素子、マイクロ

カプセル代替品など、種々の機能性リポソームとして利用できる。

【0034】なお、反応性リポソームを製造する際、他の膜形成成分として重合性リン脂質を配合することにより、重合性の反応性リポソームとすることができます。重合性のリン脂質としては、公知の重合性リン脂質を使用することができるが、例えば1, 2-ジ(2, 4-オクタデカジエノイル)-3-ホスファチジルコリンの他、野島庄七、砂本順三、井上圭三編集、1988年南江堂発行の「リポソーム」p 313~315に記載のものなどがあげられる。これらの中では、1, 2-ジ(2, 4-オクタデカジエノイル)-3-ホスファチジルコリンが好ましい。

【0035】重合性リポソームは、リポソーム調製後に、光重合開始剤の存在下または非存在下でUV、γ線、電子線などの光照射を行うことにより、あるいはレドックス開始剤系により、あるいはアゾ系開始剤または有機過酸化物などの存在下で加熱を行うことにより、容易に重合を行うことができる。このようにして得られた重合後のリポソームは、優れた安定性を有しているので、水溶液に分散させたままで、あるいは凍結乾燥等により粉末状に調製し、安定して使用することができる。

【0036】他の反応性小胞体としての反応性脂肪乳剤は、本発明の反応性小胞体形成剤と、大豆油、サフラワー油等の植物油と、大豆レシチン、卵黄レシチン等のリン脂質と、必要により添加される他の添加剤、例えばイントラリピッド(大塚製薬(株)製、商標)、乳化補助剤、安定化剤、等張化剤、脂溶性医薬、脂溶性生理活性物質などを含む油脂混合物が乳化されたものである。油脂混合物中に占める反応性小胞体形成剤の含有量は、0.1~50モル%、好ましくは0.5~30モル%であるのが望ましい。

【0037】反応性脂肪乳剤は、公知の方法により製造することができる。例えば、本発明の反応性小胞体形成剤、植物油、他のリン脂質および必要により配合する添加剤を混合、加熱し、水を加えてホモミキサー等で粗乳化し、次にマントンガウリン型の加圧噴射式ホモジナイザー等で均質化する方法などにより製造することができる。

【0038】このようにして得られた反応性脂肪乳剤には、反応性リポソームの場合と同様にして、同様の機能性物質を容易に固定化することができ、機能性物質固定化脂肪乳剤が得られる。このため反応性脂肪乳剤は、機能性物質を固定化して機能性物質固定化脂肪乳剤の形態で、医薬の運搬体、検査薬、診断薬、センサー、固定化触媒などとして利用できる。

【0039】上記以外の反応性小胞体である反応性ミセルは、本発明の反応性小胞体形成剤だけからなるものであっても、レシチン、コレステロール、リン脂質等の他の成分が含有されているものであってもよい。反応性ミ

セルも反応性脂肪乳剤と同様にして機能性物質を固定化することができ、同様の用途に利用できる。

【0040】

【発明の効果】本発明の反応性小胞体形成剤は、一般式〔1〕で表わされる構造を有しているので、小胞体に(ポリ)オキシアルキレン鎖を導入できるとともに、この(ポリ)オキシアルキレン鎖の先端に、簡単にかつ効率よく種々の機能性物質を共有結合により、または電気的に固定化することができる。この場合、小胞体は長期間の保存安定性に優れている。また本発明の反応性小胞体形成剤を小胞体形成成分として用いることにより、(ポリ)オキシアルキレン鎖導入の効果、例えば長期間にわたる血液中濃度の維持、非免疫原性、小胞体に内包した物質の漏れ防止などの効果も期待できる。

【0041】本発明の反応性小胞体は、上記反応性小胞体形成剤を小胞体形成成分として含有しているので、反応性小胞体形成剤が脱離せず、長期間の安定性に優れている。また(ポリ)オキシアルキレン鎖からなるスペーサーを介して、簡単にかつ効率よく種々の機能性物質を共有結合により、または電気的に固定化することができる。

【0042】本発明の機能性物質固定化小胞体は、(ポリ)オキシアルキレン鎖の先端に機能性物質が固定化されているので、機能性物質の活性が十分に発揮される。

【0043】本発明の機能性物質固定化小胞体の製造方法は、水溶性の脱水縮合剤の存在下に、上記反応性小胞体に機能性物質を反応させるようにしているので、一段階の反応で簡単に、しかも小胞体にダメージを与えることなく機能性物質固定化小胞体を製造することができる。

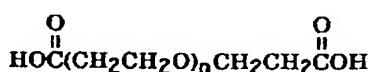
【0044】

【実施例】以下、実施例により、さらに詳細な説明を行うが、本発明はこれらに限定されるものではない。

合成例1

両末端にカルボキシル基を有するポリエチレングリコール誘導体 ($M_w \approx 3000$)

【化6】

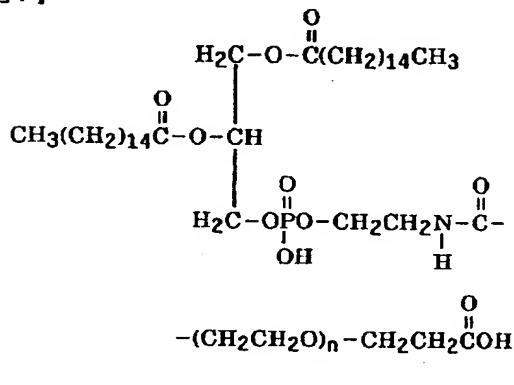


$n=65$

3.0 g (0.9 mmol) およびジシクロヘキシルカルボジイミド 204 mg (0.9 mmol) を酢酸エチル 10 ml に溶解させ、5°Cで30分間攪拌した。次にジバルミトイールホスファチジルエタノールアミン 217 mg (0.3 mmol) を溶解させた酢酸エチル溶液 10 ml を加え、さらに6時間攪拌した後、0°Cで一晩静置し、析出物をろ過除去した。得られた反応混合物をヘキサン 100 ml 中に注ぎ込み、沈殿物をろ過回収し、

目的の下記化合物からなる反応性小胞体形成剤を白色粉末状で得た(収率 8.8%)。反応の進行は、IRスペクトル (KBr 法)において、ホスファチジルエタノールアミン中のアミノ基 (3000 cm⁻¹) の消失およびアミド結合 (C=O 伸縮、1647 cm⁻¹) の生成により確認した。

【化7】



【0045】実施例 1-1

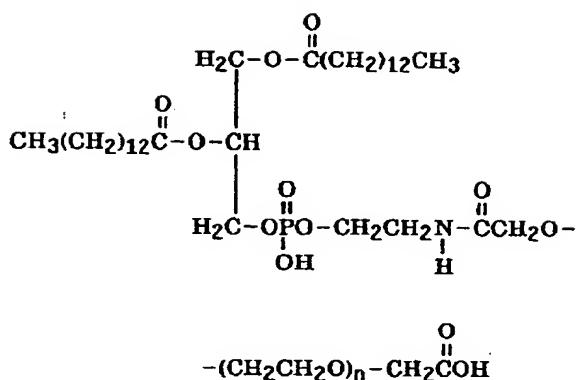
卵黄ホスファチジルコリン 20 mg (26 μmol)、コレステロール 3.9 mg (10 μmol) および合成例1で得られた化合物 2.4 mg (前記二者に対して 10 重量%) をナス型フラスコに入れ、2 ml のベンゼンで溶解させた後、凍結乾燥を行った。これに生理的食塩水 1 ml を加え、バス型超音波照射およびボルテックスミキサーによりリポソーム化し、多重層リポソームを得た。さらにエクスツルーダーにより 3.0 → 1.0 → 0.2 μm のポリカーボネートメンブランを順次通過させ、大きな一枚膜リポソームを得た。得られた反応性リポソームの粒径をレーザー散乱粒度分布計 (N I C O M P 社製、N I C O M P 370 H P L、商標) を用いて測定したところ、平均粒径 254 nm (CV 値 1.8%) であった。上記リポソームを 5°C で 1か月間静置した後平均粒径を測定したところ、平均粒径 259 nm、CV 値 1.9% であり、安定性に優れていた。

【0046】実施例 1-2

実施例 1-1 と同様にして、ただし反応性小胞体形成剤として下記の反応性ポリアルキレンオキシド誘導体を他の成分 2 者に対して 5 重量% の量で用いて反応性リポソームを得た(平均粒径 275 nm、CV 値 2.1%)。上記リポソームを 5°C で 1か月間静置した後平均粒径を測定したところ、平均粒径 278 nm、CV 値 2.2% であり、安定性に優れていた。

【化8】

13



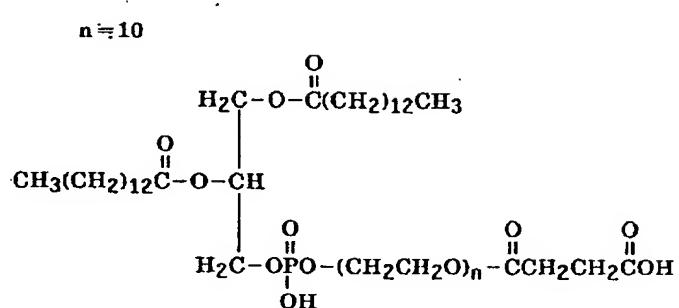
14

【0047】実施例1-3

実施例1-1と同様にして、ただし反応性小胞体形成剤として下記の反応性ポリアルキレンオキシド誘導体を他の成分二者に対して30重量%の量で用いて反応性リポソームを得た（平均粒径238nm、CV値25%）。上記リポソームを5°Cで1か月間静置した後平均粒径を測定したところ、平均粒径240nm、CV値24%であり、安定性に優れていた。

【化9】

10

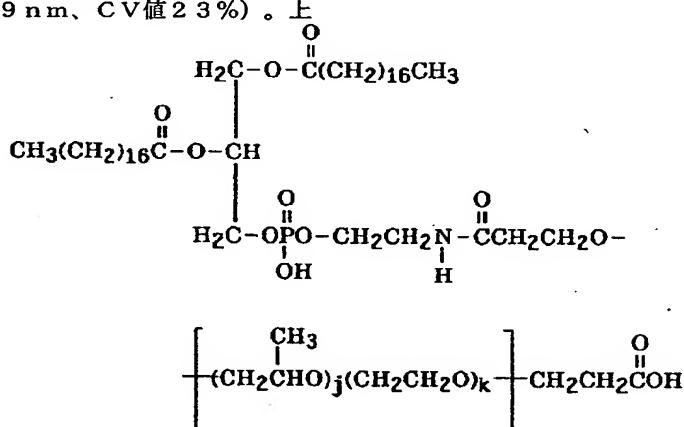
 $n=30$

【0048】実施例1-4

実施例1-1と同様にして、ただし反応性小胞体形成剤として下記の反応性ポリアルキレンオキシド誘導体を他の成分二者に対して1重量%の量で用いて反応性リポソームを得た（平均粒径249nm、CV値23%）。上

記リポソームを5°Cで1か月間静置した後平均粒径を測定したところ、平均粒径258nm、CV値26%であり、安定性に優れていた。

【化10】

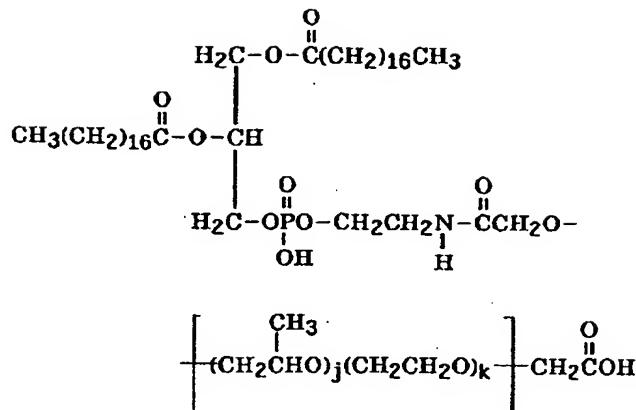
 $j=10, k=25$ (ランダム状に付加)

【0049】実施例1-5

実施例1-1と同様にして、ただし反応性小胞体形成剤として下記の反応性ポリアルキレンオキシド誘導体を他の成分二者に対して5重量%の量で用いて反応性リポソームを得た（平均粒径246nm、CV値24%）。上

記リポソームを5°Cで1か月間静置した後平均粒径を測定したところ、平均粒径251nm、CV値26%であり、安定性に優れていた。

【化11】



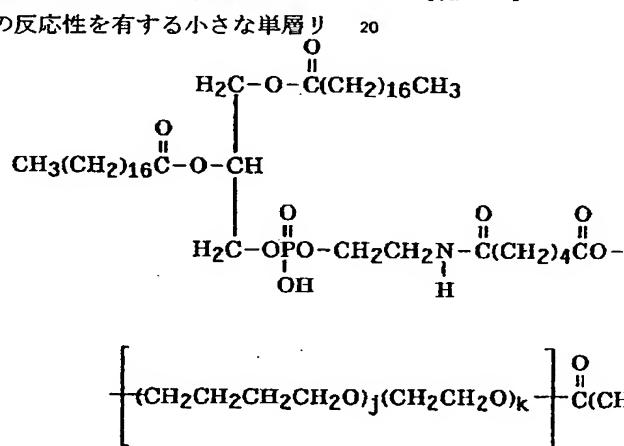
$j = 10, k = 15$ (ブロック状に付加)

【0050】実施例1-6

実施例1-1と同様にして、ただし反応性小胞体形成剤として下記の反応性ポリアルキレンオキシド誘導体を他の成分二者に対して5重量%の量で用いて平均粒径29.9nm(CV値2.5%)の反応性を有する小さな単層リ

ポソームを得た。上記リポソームを5℃で1か月間静置した後平均粒径を測定したところ、平均粒径29.9nm、CV値2.7%であり、安定性に優れていた。

【化12】



$j = 5, k = 278$ (ブロック状に付加)

【0051】実施例1-7

実施例1-1と同様にして、ただし卵黄ホスファチジルコリンの代わりに1,2-ジ(2,4-オクタデカジエノイル)-3-ホスファチジルコリン(DODP)を用いて、平均粒径24.9nm(CV値2.7%)の反応性を有する大きな一枚膜リポソームを得た。このリポソームに0.75Mradのγ線照射を行ってDODPを重合させた。得られた反応性の重合性リポソームは、Sephadex G-50を用いてゲル濾過後、凍結乾燥して粉末状サンプルとした。このリポソーム粉末は、生理的食塩水で膨潤させ、再生することができた。

【0052】実施例2-1

実施例1-1で得られたりポソーム溶液(固形分量0.25%)の500μlに、1mg/mlの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩水溶液(pH5)500μlを加え、5℃で30分

間攪拌した。さらに1mg/ml濃度の西洋山葵ペルオキシダーゼ(以下、HRPと略す)/0.1Mリン酸緩衝液(pH7.5)100μlを加え、5℃で24時間攪拌してHRPをリポソームに固定化した。これをSephadex G-50を用いてゲル濾過を行い、含りリポソーム分画を分取し、HRP固定化リポソームを得た。このようにして得られたHRP固定化リポソーム溶液500μlに、HRPの基質である1,2-フェニレンジアミン溶液(10mmol/l)100μlを加え、30℃で10分間インキュベートし、さらに0.1N硫酸10μlを加えたところ、褐色の呈色が見られた。この結果から、実施例1-1の反応性リポソームは、HRPと攪拌するだけでHRPを固定化できることが確認できた。

【0053】実施例2-2ないし2-7

実施例1-2ないし1-7で得られた反応性リポソーム

を用いて実施例2-1と同様にしてHRPを固定化し、HRP固定化リポソームを得た。それぞれのHRP固定化リポソームについて実施例2-1と同様にして発色試験を行ったところ、いずれの場合も褐色の呈色が見られ、HRPの固定化が確認された。

【0054】比較例1

卵黄ホスファチジルコリン20mg(26μmol)、コレステロール3.9mg(10μmol)のみを用いて、実施例1-1と同様の操作により、固形分量2.5%の多重層リポソームを得た。このリポソームに実施例2-1と全く同様にしてHRPを作用させ、ゲルfiltrationにより精製した。得られたリポソーム溶液の500μlに、1,2-フェニレンジアミン溶液(10mmol/1)100μlを加え、30℃で10分間インキュベートし、さらに0.1N硫酸10μlを加えたが、発色は見られなかった。この結果から、反応性小胞体形成剤を膜形成成分として含まない比較例1のリポソームでは、HRPを固定化することができなかつたことがわかる。

【0055】比較例2

卵黄ホスファチジルコリン20mg(26μmol)、コレステロール3.9mg(10μmol)およびα-ステアリル-ω-ヒドロキシポリオキシエチレン(平均付加モル数約10)2.4mg(前記二者に対して10重量%、7μmol)をナス型フラスコに入れ、2mlのベンゼンで溶解させた後、凍結乾燥を行った。これに生理的食塩水1mlを加え、バス型超音波照射およびボルテックスミキサーにより、リポソーム化し、多重層リポソームを得た。さらなるエクストルーダーにより3.0→1.0→0.2μmのポリカーボネートメンブランを順次通過させ、大きな一枚膜リポソームを得た。得られたリポソームの平均粒径を測定したところ、平均粒径196nm(CV値11%)であった。さらに、5℃で一週間静置後、再び平均粒径を測定したところ288nm(CV値6.5%)と、平均粒径、CV値ともに大きく変化しており、リポソームが安定に存在していないことが分かった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.